



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

HELMARCOS NUNES PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ULTRARRÁPIDA PARA
DETERMINAÇÃO DE CLONAZEPAM EM URINA**

**CAMPINA GRANDE – PB
2014**

HELIMARCOS NUNES PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ULTRARRÁPIDA PARA
DETERMINAÇÃO DE CLONAZEPAM EM URINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sayonara Maria Lia Fook

CAMPINA GRANDE – PB
2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

P436d Pereira, Helimarcos Nunes.

Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico por cromatografia líquida ultrarrápida para determinação de clonazepam em urina [manuscrito] / Helimarcos Nunes Pereira. - 2014.

36 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Sayonara Maria Lia Fook, Departamento de Farmácia".

1. Toxicologia. 2. Cromatografia. 3. Farmacologia. I.
Título.

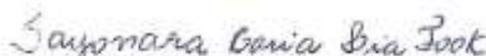
21. ed. CDD 615.9

HELIMARCOS NUNES PEREIRA

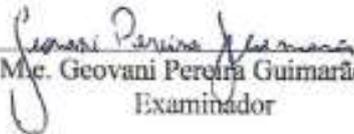
**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ULTRARRÁPIDA PARA
DETERMINAÇÃO DE CLONAZEPAM EM URINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

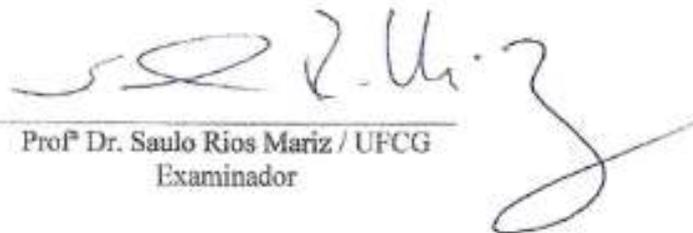
Aprovado em 26/11/2014.



Prof.^a Dr.^a Sayonara Maria Lia Fook / UEPB
Orientadora



Prof. M.c. Geovani Pereira Guimarães / UEPB
Examinador



Prof.^a Dr. Saulo Rios Mariz / UFCG
Examinador

DEDICATÓRIA

A toda minha família pelo apoio incondicional, confiança, carinho e amor dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos, proteção e orientação no meu caminho. Sem ele não teria trilhado meu caminho e feito às escolhas certas que me levaram até aqui. Só tenho a agradecer e colocar minha vida diante dele.

Aos meus pais, Lindalva e Antonio, por toda dedicação e apoio prestados durante toda minha trajetória, pois sem vocês eu não teria conseguido me levantar após cada queda, ultrapassar cada obstáculo e seguir em frente sempre em busca de meus sonhos e anseios. Quero agradecer e partilhar desse momento com vocês que sempre estiveram ao meu lado, dividindo as lágrimas e também os sorrisos.

Ao meu querido avô Antonio que sempre me acalentou com suas palavras carinhosas e me ensinou com sua rica experiência de vida, sempre acreditando em meu futuro e me dando ânimo para continuar meu caminho. E também aos meus outros avós “Dedim”, Maria José e Sebastiana que estão na companhia de Deus e sempre olham por mim e estão sempre a me iluminar.

Aos meus irmãos Maria da Guia e Raimundo que estiveram comigo me incentivando, dividindo as lutas e, cada um ao seu jeito, me ajudando sempre que possível.

A Celestiane que desde que entrou em minha vida vem compartilhando todos os momentos, sejam eles difíceis ou agradáveis, e ofereceu apoio, subsídio e carinho.

A minha orientadora professora Sayonara que exerceu seu papel de mestre no seu sentido mais amplo, contribuindo de forma decisiva na minha formação acadêmica e também como ser humano.

A minha amiga Palas que me ajudou na rotina diária no laboratório e forneceu conhecimentos muito importantes para o desenvolvimento da minha pesquisa. E também aos demais colegas do Certbio: Aline, Aleska, Fernanda, Gabriela, Karla, Rejane, Paulo e também aos demais que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho.

Aos colegas de sala pelos momentos de alegria, amizade e por tudo que vivemos nesses cinco anos. E, em especial a Ízola, Tatiane, Bruna, Maciel, Gabriela e Jhonata que estiveram mais próximos e compartilharam as dificuldades e me proporcionaram momentos inesquecíveis que irão deixar saudades e que para sempre estarão guardados na minha memória.

Á todos os professores do curso de Farmácia que me forneceram os conhecimentos necessários para exercer a profissão de Farmacêutico. A vocês reservo meu sincero agradecimento pelos ensinamentos repassados.

Ao CNPQ e a UEPB que forneceram apoio financeiro e estrutural para realização deste trabalho.

E aos professores Saulo e Geovani que aceitaram participar da banca examinadora e contribuir neste trabalho.

“Não se deixe levar pela distância entre seus sonhos e a realidade. Se você é capaz de sonhá-los, também pode realizá-los.”

William Shakespeare

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ULTRARRÁPIDA PARA DETERMINAÇÃO DE CLONAZEPAM EM URINA

PEREIRA, Helimarcos Nunes¹; FOOK, Sayonara Maria Lia²

RESUMO

O reconhecimento do quadro de intoxicação por medicamentos é feito através do diagnóstico clínico e laboratorial. As análises toxicológicas auxiliam quando a história não é clara e os sintomas são de moderado a grave. Existem vários métodos para identificação de agentes tóxicos em amostras biológicas. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido utilizada, desde que sejam observados os parâmetros de validação da metodologia. Tendo em vista essa problemática o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica para identificação e quantificação do clonazepam em urina. Os ensaios cromatográficos foram realizados e adaptados de acordo os requisitos estabelecidos pelas Resoluções-RE nº 27 de 17 de maio de 2012 e a de nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Durante a validação foram otimizados o processo de extração do clonazepam na urina e análise cromatográfica, sendo obtidas condições apropriadas. E também foram avaliados com resultados satisfatórios os parâmetros seletividade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e robustez, comprovando a eficiência e confiabilidade do método. Na ocorrência dos eventos toxicológicos a utilização de metodologias analíticas validadas é uma ferramenta útil para garantir métodos eficientes na detecção dos agentes tóxicos e contribuir no diagnóstico e prognóstico das intoxicações. Desta forma, a metodologia de análise de clonazepam por Cromatografia Líquida ultrarrápida pode ser uma ferramenta útil no manejo clínico do paciente intoxicado por este fármaco.

PALAVRAS-CHAVE: Cromatografia. Toxicologia. Farmacologia.

¹Acadêmico em Farmácia pela Universidade Estadual da Paraíba.
nunesp1@live.com.

² Professor (a) doutor (a) do departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba.
sayonarafook@yahoo.com.br.

1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos se destacam como os principais agentes envolvidos nos casos de intoxicação exógena no Brasil, conforme indicam os relatórios dos órgãos de coleta e divulgação desses casos a nível nacional (SINITOX, 2011). Entre as classes terapêuticas relatadas os benzodiazepínicos (BZDs) são mencionados com frequência como classe terapêutica empregada em episódios de superdosagem de medicamentos.

Os BZDs estão entre os psicofármacos mais prescritos no mundo e são utilizados principalmente como ansiolíticos e hipnóticos. Além da psiquiatria, suas principais indicações são antiepiléticos, relaxantes musculares, espasmos musculares involuntários e coadjuvantes na anestesia (CASTRO et al., 2013; TELLES FILHO et al., 2011). E no mercado farmacêutico existe uma grande diversidade desses fármacos, os quais se aplicam a várias indicações terapêuticas.

Pesquisas mais recentes apontam o diazepam e o clonazepam (CLZ) como os Benzodiazepínicos mais utilizados no Brasil (TELLES FILHO et al., 2011). A alta prevalência do uso desses fármacos pode ser explicada pela existência do Programa Nacional de Assistência Farmacêutica que distribui gratuitamente, mediante apresentação de receita, esses dois medicamentos (BRASIL, 2007).

Devido a uma maior popularização e aceitação terapêutica o clonazepam vem se destacando nos últimos estudos de caráter epidemiológico como o Benzodiazepínico mais usado (BETTIOL, 2012). As características farmacológicas do CLZ são similares as dos demais BZDs; possuindo efeitos ansiolíticos, sedativos e propriedades serotoninérgicas.

Pelo fato de possuir características farmacodinâmicas e farmacocinéticas vantajosas esse fármaco apresenta grande versatilidade de aplicações clínicas. Por outro lado, são muitos os relatos descrevendo casos de abuso desse medicamento, envolvendo tentativas de suicídio, crimes sexuais, homicídios, superdosagem; entre outros (ADAMOWICZ, KALA, 2010; BATISSE et al., 2014; SMINK et al., 2008).

Nesse sentido, atualmente é recomendada a realização de análises para detecção deste fármaco em diferentes matrizes biológicas e com diversas finalidades e estas, em sua maioria, empregam métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (BARES, 2004; CHEZÉ; VILLAIN; PEPÍN, 2004).

Na última década o desenvolvimento da CLAE tem sido direcionado à necessidade de análises mais rápidas, entretanto sem o comprometimento do desempenho cromatográfico (MALDANER; JARDIM, 2009). Nesse sentido, em 2006 se deu o surgimento do sistema de

Cromatografia Líquida Ultrarrápida (UFLC), atendendo ao anseio de análises com tempo reduzido e com alta eficiência. A UFLC é uma alternativa preferível a CLAE convencional, uma vez que diminui o tempo de análise e o volume de fase móvel utilizada em análises de drogas (PANDA et al., 2012).

Mesmo esses métodos sofisticados e que empregam alta tecnologia necessitam passar por um processo de validação, o qual se constitui em um requisito para quantificação de qualquer composto endógeno ou exógeno em matrizes biológicas (CASSIANO et al., 2009). Esse processo é uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante a rotina laboratorial, para tanto se utiliza parâmetros específicos e bem determinados (RIBEIRO et al., 2008).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibiliza normas para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, determinando os parâmetros a ser realizados e os procedimentos adotados (RIBANI et al., 2004). Atualmente as normas vigentes para a validação de métodos bioanalíticos são a RE nº 899/2003 e a RDC nº 27/2012 ambas da ANVISA.

A Resolução ANVISA RE nº 899 descreve os seguintes parâmetros ou figuras de mérito para validação de métodos bioanalíticos: Especificidade, Curva de calibração/linearidade, precisão, exatidão, limite inferior de quantificação (LIQ), Limite de detecção (LD), recuperação, controle de qualidade (CQ) e estudos de estabilidade do fármaco em líquidos biológicos (BRASIL, 2003).

Contudo, são descritos na literatura diversos trabalhos tratando da validação de métodos que visam à identificação e quantificação do fármaco clonazepam em matrizes biológicas distintas. Entretanto, os mesmos geralmente se destinam à avaliação no âmbito forense ou acompanhamento terapêutico e não em casos de intoxicação aguda (ADAMOWICZ; KAŁA, 2010; BARES; PEHOURCQ; JARRY, 2004; BORGES et al, 2009; COUTINHO, 2007).

Nessa perspectiva, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para identificação e quantificação de clonazepam em urina nos casos de intoxicação aguda, utilizando a técnica de separação cromatográfica do tipo Cromatografia Líquida Ultrarrápida (UFLC).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BENZODIAZEPÍNICOS (BZDS)

Na década de 50, diante do elevado risco oferecido pelo tratamento ansiolítico com Barbitúricos, foram mobilizados esforços visando à descoberta de novas substâncias tranquilizantes (FERRAZ, 2010). Em seguida, se deu a descoberta dos Benzodiazepínicos (BZDs), possibilitando a diferenciação entre sedativos, hipnóticos e tranquilizantes, sendo o clordiazepóxido o primeiro da classe a ser comercializado (COELHO, 2011; FORSAN, 2010).

O mecanismo de ação dessas substâncias se baseia na interação com um grupo de receptores denominados GABA_A localizados no sistema nervoso central (SNC) e que são responsáveis pela resposta inibitória. Essa interação ocorre de forma indireta, pois os receptores dos Benzodiazepínicos se situam na mesma estrutura desses receptores e dessa forma aumentam a resposta ao GABA (neurotransmissor inibitório). Desse modo, os compostos supracitados apresentam os efeitos de sedação, redução da ansiedade e agressividade, indução do sono, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e anticonvulsivante (FUCHS; WANNMACHER, 2010; RANG; DALE, 2012).

A classe dos BZDs apresentou vantagens como a segurança e uma tolerância diminuída, fatores responsáveis pela sua aceitação e formidável sucesso (FERRAZ, 2010). Além disso, segundo Fuchs e Wannmacher (2010), eles substituíram os barbitúricos como hipnóticos, uma vez que os BZDs possuem um maior índice terapêutico e não são indutores enzimáticos.

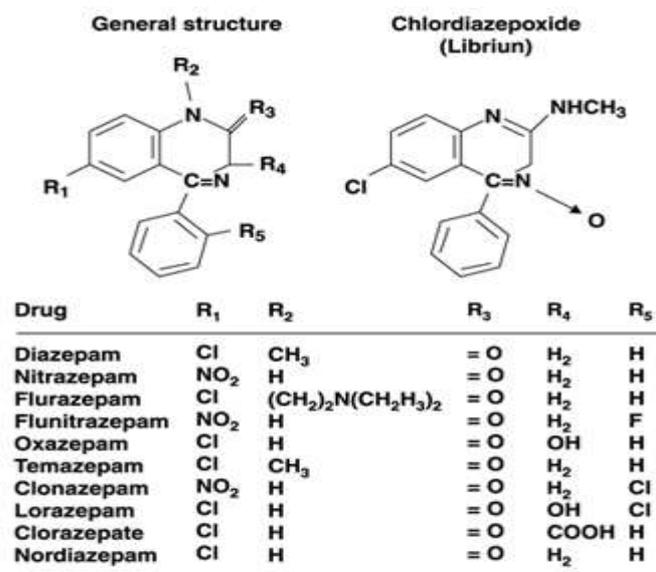
Motivada por sua relativa segurança, na medida em que são necessárias altas doses de BZDs para um efeito tóxico, sua prescrição e utilização ocorrem de forma abusiva; mesmo sendo medicamentos controlados e dispensados apenas mediante apresentação de receituário médico (TELLES FILHO et al., 2011).

Estimativas apontam que o consumo de Benzodiazepínicos dobra a cada período de cinco anos. Esse consumo crescente pode ter sido resultado da introdução copiosa de novas drogas pertencentes a essa classe, a pressão crescente através de propaganda efetuada pela indústria farmacêutica ou, ainda, hábitos de prescrição inadequada por parte dos prescritores (CASTRO et al., 2013).

Segundo Coutinho (2007), os Benzodiazepínicos podem ser classificados de acordo com a rapidez de eliminação ou a resposta farmacodinâmica dos seus metabólitos ativos. Desta forma, se dividem em: de curta duração (tempo de meia vida situado entre 6 e 12 horas), duração intermediária (tempo de meia vida entre 12 e 24 horas) e de longa duração (tempo de meia vida superior a 24 horas).

Uma segunda classificação possível para esse grupo de substâncias se baseia nas suas estruturas químicas. Nesse sentido, possuem em comum um anel benzênico acoplado a um anel diazepínico e um grupamento arila substituinte na posição 5, formando um terceiro anel com a estrutura geral 5-aryl-1,4 Benzodiazepínicos. A partir desse pressuposto, há cinco classes dessas substâncias: 2-ceto (clordiazepóxido, diazepam, flunitrazepam), 3-hidroxi (lorazepam e oxazepam); 7-nitro (nitrazepam e clonazepam), triazolo (alprazolam e triazolam) e imidazolo (midazolam) (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Figura 1. Estrutura química dos Benzodiazepínicos.



Fonte: COELHO et al., 2006

Em estudo realizado por Auchewskiet et al. (2004), foi observado que os principais efeitos adversos que comprometem o usuário de BZDs são a diminuição da atividade psicomotora, prejuízo da memória e o desenvolvimento de dependência.

Em casos de superdosagem pode haver hipotonia muscular, dificuldade de deambulação e desmaio, contudo a letalidade é rara. Entretanto, episódios graves de intoxicação por fármacos desse grupo são desencadeados pela administração conjunta de outros depressores do SNC (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Para tratamento da intoxicação aguda por BZDs se faz uso do Flumazenil, um antagonista seletivo do GABA disponível para uso clínico que pode ser usado nos casos mais

graves, caso ocorra depressão neurológica e/ou respiratória (AMARAL, 2010; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

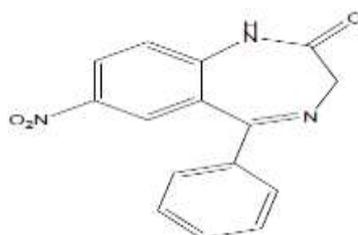
Além dos casos de intoxicação advindos da superdosagem também são relatados que os BZDs estão relacionados a crimes como suicídio, homicídio, violência sexual e acidentes no trânsito (SMINK et al., 2008). Desta forma, o desenvolvimento de métodos analíticos para detecção (*screening*) e para quantificação de Benzodiazepínicos é importante para determinar o envolvimento desta classe de compostos nesses casos. Vários desses fármacos estão inseridos em análises de rotina de drogas, devido a sua frequente presença em casos clínicos e forenses (MAGALHÃES, 2012).

As pesquisas mais recentes apontam o diazepam e o clonazepam como os Benzodiazepínicos mais utilizados no Brasil (TELLES FILHO et al., 2011). A alta prevalência do uso desses fármacos a nível nacional pode ser explicada pela existência do Programa Nacional de Assistência Farmacêutica que distribui gratuitamente, mediante apresentação de receita, esses dois medicamentos (BRASIL, 2007). E devido a uma maior popularização e aceitação terapêutica o clonazepam vem se destacando nos últimos estudos de caráter epidemiológico como o Benzodiazepínico mais usado (BETTIOL, 2012).

2.2 CLONAZEPAM (CLZ).

O CLZ é um fármaco pertencente ao grupo dos Benzodiazepínicos (Figura 2). A nomenclatura química do CLZ [5- (2-clorofenil) -1,3-di-hidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona] denota sua classificação como 7-nitrobenzodiazepina (NEGRUSZ et al., 2003).

Figura 2. Estrutura química do clonazepam.



Fonte: FERRAZ, 2010.

A molécula do referido fármaco foi sintetizada a partir do nitrazepam através do processo de halogenação. O CLZ se caracteriza por apresentar uma estrutura molecular relativamente simples e por isso foi um dos primeiros de sua classe a ser sintetizado em laboratório, sendo assim é considerado um “Benzodiazepínico clássico” (FERRAZ, 2010).

O clonazepam se apresenta em termos físico-químicos como um pó cristalino branco e insolúvel em água (solubilidade igual a 100 mg/L), com coeficiente de partição de 2,41, ponto de fusão variando entre 236,5-238,5 ° C, peso molecular de 315,71 g/mol e um PKa de 1,50 (DRUGBANK, 2005; FERNER, 2008).

Segundo Ganança et al. (2002), as características farmacológicas do CLZ são similares às dos demais Benzodiazepínicos; possuindo efeitos ansiolíticos, sedativos e propriedades serotoninérgicas. Esse composto é capaz de estimular a produção de serotonina a nível central e facilitar a transmissão do Ácido-Gama-Aminobutírico (GABA). Além dessas propriedades, o mesmo é considerado um fármaco seletivo para o tratamento da epilepsia, pois potencializa os canais de GABA no núcleo talâmico impedindo, dessa forma, o ciclo tálamo-cortical sincrônico reticular, responsável por descargas repetitivas nos ataques epilépticos (GOLAM, 2009; RANG; DALE, 2012).

A dose diária de uso geralmente se situa entre 1,5 e 10 mg. Esse fármaco é rapidamente e totalmente absorvido após a administração por via oral. A biodisponibilidade absoluta do clonazepam é de aproximadamente 90%, com uma concentração máxima sendo alcançada entre 1-4 horas (GOODMAN; GILMAN; BRUNTON, 2012).

Em relação a outros aspectos farmacocinéticos como o metabolismo e eliminação é conhecido que esse Benzodiazepínico possui metabolização hepática (citocromo P450, incluindo CYP3A). A biotransformação acontece prioritariamente através da redução do grupo 7-nitro para o derivado 7-aminoclonazepam, sendo que apenas 2% da dose são excretadas de forma inalterada na urina (DRUGBANK, 2005).

Segundo Bares (2004), o citado fármaco demonstra uma estreita faixa terapêutica plasmática de 10 a 50 ng/mL. Devido a isso, o monitoramento do tratamento com clonazepam em pacientes epilépticos é recomendado. Além disso, também são muitos os relatos descrevendo casos de abuso desse medicamento, envolvendo tentativas de suicídio, crimes sexuais, homicídios, entre outros (ADAMOWICZ, KALA, 2010; BATISSE et al., 2014; SMINK et al., 2008).

Assim, atualmente é preconizada a realização de análises para sua detecção em diferentes matrizes biológicas e com diversas finalidades e, estas em sua maioria, empregam métodos cromatográficos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (BARES, 2004; CHEZÉ; VILLAIN; PEPÍN, 2004).

2.3 ANÁLISE TOXICOLÓGICA NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DAS INTOXICAÇÕES.

Os métodos analíticos para detecção e quantificação de fármacos em matrizes biológicas são considerados notáveis instrumentos para diagnóstico de intoxicações (SEBBEN et al., 2010). Além disso, segundo Volonté et al.(2010), eles também são úteis na evolução e interpretação de dados colhidos em estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética.

Existem vários critérios para se diagnosticar clinicamente ou laboratorialmente os casos de intoxicação. Entre eles está o critério físico-químico ou toxicológico, o qual se baseia no isolamento, identificação ou doseamento dos agentes tóxicos suspeitos no material examinado através de métodos qualitativos ou quantitativos específicos ou de métodos que norteiam para um grupo de substâncias capazes de serem biotransformadas (FRANÇA, 2005).

Nessa perspectiva, Bulcão et al. (2010) referem que é necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas que se adequem às necessidades dos profissionais envolvidos no diagnóstico e na terapêutica dos casos de intoxicações, tendo em vista a necessidade de se estabelecer ações preventivas mais eficazes.

Tais metodologias analíticas necessitam de ser submetidas a um processo de acreditação que lhes confere confiabilidade e rigor analítico para serem usadas com finalidades de identificação de substâncias de utilização terapêutica, agentes tóxicos e diversas outras substâncias de interesse (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Para assegurar que um método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação chamada validação para constatar por ensaios e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são cumpridos (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

Esse processo consiste num conjunto de ensaios e testes contínuos que se iniciam no planejamento da estratégia analítica e permanece ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência, sendo que no Brasil o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibilizam normas para a realização de tais procedimentos (RIBANI et al., 2004).

Para os procedimentos bioanalíticos a ANVISA possuía como guia a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Entretanto, recentemente essa legislação foi revogada pela Resolução ANVISA RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

Os requisitos preconizados para o processo em questão não apresentam um consenso de exigências e metodologias entre os diversos órgãos regulatórios (BRASIL, 2003, 2012; ICH, 2005). Entretanto, em âmbito nacional a maioria dos trabalhos existentes na literatura que descrevem métodos bioanalíticos consideram a Resolução ANVISA RE nº 899 como norteadora, visto que a RDC nº 27/2012 é mais recente e ainda carece de trabalhos utilizando a mesma.

A Resolução ANVISA RE nº 899/2003 descreve os seguintes parâmetros ou figuras de mérito para validação de métodos bioanalíticos: Especificidade, Curva de calibração/linearidade, precisão, exatidão, limite inferior de quantificação (LIQ), Limite de detecção (LD), recuperação, controle de qualidade (CQ) e estudos de estabilidade do fármaco em líquidos biológicos (BRASIL, 2003).

Entretanto, a resolução mais recente, apesar de se destinar prioritariamente a validação de estudos com fins de registro e pós registro de medicamentos; modificou alguns aspectos da validação dos métodos bioanalíticos. Assim, a mesma alterou a denominação do parâmetro especificidade, passando a denominar seletividade e acrescentou os parâmetros efeito residual, efeito matriz e estabilidade do analito e padrão interno em solução. Além disso, ela adotou critérios mais rigorosos para os parâmetros de seletividade, precisão, e exatidão (BRASIL, 2012).

A seletividade pode ser definida como a capacidade do método de distinguir e quantificar a substância de interesse e padrão interno na presença de outros constituintes da amostra (BRASIL, 2012). Esses interferentes podem ser moléculas com propriedades químicas relacionadas com o analito, entre elas isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, produtos de degradação, impurezas e outros (PASCHOAL et al., 2008). Tal parâmetro pode ser avaliado de várias formas, sendo uma delas a comparação entre a matriz isenta da substância de interesse e ela adicionada com esta substância (RIBANI et al., 2004).

O efeito residual avalia se ocorre a interferência de substâncias contidas em amostras analisadas em corridas analíticas anteriores. Caso o efeito residual não possa ser evitado, procedimentos específicos são necessários na realização do método com o intuito de controlar seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam comprometidas (BRASIL, 2012).

Segundo Barros (2002), a robustez deve ser pesquisada na etapa de desenvolvimento do método e usualmente é realizada avaliando alguns parâmetros simultaneamente, aplicando a técnica estatística de planejamento de experimento. Com os dados obtidos dos efeitos destes parâmetros nos resultados, pode-se delimitar a faixa aceitável de valores a ser incluída no método final. Assim, esse parâmetro atesta a confiabilidade do método durante uso normal.

A linearidade é a habilidade que o método possui de fornecer resultados que são diretamente, ou através de transformações matemáticas, proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma variação determinada. Este atributo da validação pode ser determinado pela avaliação visual de um diagrama de sinais em função da concentração ou conteúdo analisado (VALENTINI et al., 2007).

A sensibilidade de um método é estabelecida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O primeiro se refere a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental e o segundo é definido como a menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2012; RIBEIRO et al., 2008; VALENTINI et al., 2007).

Precisão do método analítico é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, com condições pré-estabelecidas (BARROS, 2002). Já a exatidão determina o erro de uma medida analítica e é um dos principais critérios usados para decidir sobre a qualidade de uma determinada metodologia bioanalítica. (CASSIANO et al., 2009).

O efeito da matriz, também conhecido como aumento de resposta cromatográfica induzida pela matriz, pode ser usado para explicar a taxa de recuperação acima de 100% e a baixa precisão dos resultados. Este efeito ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica coeluem com os compostos de interesse, sendo alvo de investigação em métodos bioanalíticos convencionais (CASSIANO et al., 2009).

O parâmetro de estabilidade do analito na matriz biológica deve ser avaliado através dos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração e estabilidade pós-processamento. Além deste, também é preconizada a estabilidade do analito em solução, sendo comparadas as respostas de amostras recém-preparadas com às das amostras armazenadas durante todo o processo de validação (BRASIL, 2012).

Para a validação de metodologias analíticas faz-se uso de substâncias com alto grau de pureza e livres de qualquer contaminante, são os chamados padrões de referência. A legislação vigente estabelece que devam ser utilizadas substâncias de referência oficializadas

pela Farmacopeia Brasileira ou, na ausência destas, outras oficializadas por códigos autorizados (BRASIL, 2012).

Para a avaliação dos parâmetros de validação de métodos bioanalíticos (quando aplicável) é necessária à utilização de padrões de referência. Estes são exemplares de fármacos, impurezas, produtos de degradação, reagentes, dentre outros, altamente caracterizados e de elevada pureza, cujo valor é aceito sem referência a outros padrões. O uso deles é necessário para garantir a qualidade do método (BRASIL, 2012). Outra recomendação realizada pelas resoluções normativas consiste na utilização de métodos cromatográficos e, em caso contrário, deve-se justificar a impossibilidade do não uso (BRASIL, 2012).

2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Muitos métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de quantificação de fármacos em matrizes biológicas. Os métodos mais comuns são baseados em técnicas cromatográficas tais como a cromatografia gasosa (CG) (JOYA et al.; 2010; KIM et al., 2010; VIETTE et al., 2011) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (FELLI et al., 2011; SALOMONE et al., 2011).

Segundo Holler et al. (2009), a cromatografia engloba um conjunto de métodos que possibilitam a separação de todos os constituintes de uma mistura de substâncias, identificação, quantificação ou obtenção da substância pura. Separações que em alguns casos são impossíveis de ocorrer por outros meios. Esse processo ocorre através da migração da amostra através de uma fase estacionária por intermédio de um fluido (fase móvel).

Geralmente, a CLAE ou do inglês High Performance Liquid Chromatography (HPLC) é o método físico-químico de separação com maior utilização. Esta técnica se fundamenta na interação diferenciada do analito com a fase móvel (FM) líquida e a fase estacionária (FE) não-miscível e fixa, denominada coluna cromatográfica (CAMILLO, 2014; USP, 2009).

Na CLAE, a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel que é eluída sob alta pressão. São as forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases que são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica (PERES, 2002).

Esse método tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. O sistema é composto por uma bomba, coluna cromatográfica, detector e o registrador. O resultado da análise é

visualizado à saída da coluna por intermédio de um detector que usualmente é acoplado a um computador (ROSA, 2010).

Na última década, o desenvolvimento da CLAE tem sido direcionado à necessidade de análises mais rápidas, entretanto sem o comprometimento do desempenho cromatográfico (MALDANER; JARDIM, 2009). Nesse sentido, em 2006 se deu o surgimento do sistema de Cromatografia Líquida Ultrarrápida (UFLC), atendendo ao anseio de análises com tempo reduzido e com alta eficiência. A UFLC é uma alternativa preferível a CLAE convencional, uma vez que diminui o tempo de análise e o volume da fase móvel utilizada em análises de fármacos (PANDA et al., 2012).

3 REFERENCIAL METODOLÓGICO

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

A pesquisa tratou-se de um estudo experimental e analítico. Foi desenvolvido no Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais (Certbio) no período compreendido entre Agosto de 2013 e Julho de 2014.

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E ACESSÓRIOS

Ácido clorídrico®, hidróxido de Amônio®, éter etílico®, clorofórmio®, n-hexano®, diclorometano® e isopropanol® foram obtidos da VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil); sulfato de sódio anidro (Synth, Diadema, SP, Brasil) acetronitrila grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água deionizada obtida de um sistema Milli Q. Padrões de referência clonazepam e diazepam (Pharmapele, Campina Grande, PB, Brasil); fitas de pH, filtros de papel, filtros de seringa com membrana PTFE 47mm-0,45um.

3.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Foram preparadas as soluções estoque de clonazepam (CLZ), analito de interesse, e diazepam (DZP), padrão interno (PI), na concentração de 1000 µg/ml em metanol e as mesmas foram armazenadas sob refrigeração e em recipiente de vidro âmbar. Posteriormente se realizou a análise cromatográfica de ambas na concentração de 100 µg/mL.

A separação cromatográfica foi realizada mediante a utilização de um Cromatógrafo Líquido ultrarrápido da marca SHIMADZU PROMINENCE UFLC XR/Ultra Fast Liquid Chromatography. Este é equipado com duas bombas de fluxo de solventes (LC 20AD), injetor automático, lâmpada de deutério, detector UV visível (SPD 20A) e um programa de computação para integralização dos dados (interface CBM 20A). A coluna cromatográfica é do tipo C-18 (Shimpack XR-ODS 50L x 3.0/P/N 228-41606-92).

3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

3.4.1 Otimização das condições cromatográficas

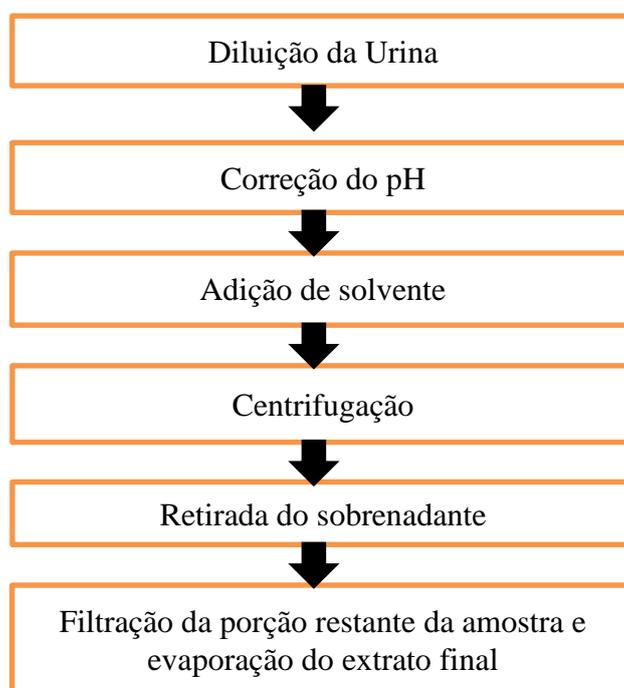
Para o desenvolvimento do método cromatográfico foram avaliados vários fatores, como: composição e vazão da fase móvel, pressão na coluna, volume de injeção, temperatura do forno, mudança de coluna e comprimento de onda de maior absorção.

Nas condições mais satisfatórias foi realizada primeiramente a corrida analítica do clonazepam, depois a do DZP (padrão interno) e posteriormente da solução contendo esses dois fármacos. No final foram obtidos os cromatogramas dessas substâncias.

3.4.2 Otimização da extração das amostras biológicas

Na fase de extração foram realizados vários procedimentos de *Clean-up*, usando extração líquido-líquido (ELL). Para a ELL foi usado o método de Stas-Otto, que considera o caráter ácido/base de cada substância e do meio em que essa se encontra bem como o seu grau de ionização como fatores influentes em sua solubilidade em solventes orgânicos (Figura 03).

Figura 03. Esquema de extração das amostras de urina fortificadas com os fármacos clonazepam e diazepam.



Fonte: Dados da Pesquisa, 2014.

Todavia, para uma extração mais eficiente do clonazepam iniciou-se a otimização do procedimento de ELL, seguida da análise por Cromatografia Líquida Ultrarrápida com detector ultravioleta (UFLC-UV). Um planejamento fatorial 2^4 foi empregado para avaliar o

efeito dos fatores escolhidos em amostras acidificadas ou alcalinizadas: diluição (amostra diluída ou amostra sem diluição), solvente (éter-clorofórmio 1:2 v/v ou diclorometano 95% para as amostras básicas e clorofórmio-isopropanol 95:5 v/v- ou Hexano 95% para as ácidas), uso do Ácido Tricloroacético-TCA (amostras com TCA ou sem TCA) e proporção solvente-amostra (1:1 v/v ou 2:1 v/v). Como o planejamento envolvia quatro fatores com dois níveis cada um (2^4), a execução do mesmo foi feita com dezesseis ensaios em duplicata (Tabela 1).

Tabela 01. Planejamento fatorial 2^4 empregado na otimização do procedimento de extração líquido-líquido para determinação de clonazepam em urinas acidificadas e alcalinizadas, 2014.

Ensaio	Fatores codificados				Fatores originais			
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	(F ₁) Solvente	(F ₂) Diluição	(F ₃) Proporção solvente- amostra	(F ₄) TCA
1	-1	-1	-1	-1	A ₁ /B ₁	Sem diluição	1:1	Sem TCA
2	+1	-1	-1	-1	A ₂ /B ₂	Sem diluição	1:1	Sem TCA
3	+1	+1	-1	-1	A ₂ /B ₂	Com diluição	1:1	Sem TCA
4	+1	+1	+1	-1	A ₂ ou B ₂	Com diluição	2:1	Sem TCA
5	+1	+1	+1	+1	A ₂ /B ₂	Com diluição	2:1	Com TCA
6	-1	+1	+1	+1	A ₁ /B ₁	Com diluição	2:1	Com TCA
7	-1	-1	+1	+1	A ₁ /B ₁	Sem diluição	2:1	Com TCA
8	-1	-1	-1	+1	A ₁ /B ₁	Sem diluição	1:1	Com TCA
9	-1	-1	+1	-1	A ₁ /B ₁	Sem diluição	2:1	Sem TCA
10	-1	+1	-1	-1	A ₁ /B ₁	Com diluição	1:1	Sem TCA
11	-1	+1	-1	+1	A ₁ /B ₁	Com diluição	1:1	Com TCA
12	-1	+1	+1	-1	A ₁ /B ₁	Com diluição	2:1	Sem TCA
13	+1	-1	-1	+1	A ₂ /B ₂	Sem diluição	1:1	Com TCA
14	+1	-1	+1	-1	A ₂ /B ₂	Sem diluição	2:1	Sem TCA
15	+1	-1	+1	+1	A ₂ /B ₂	Sem diluição	2:1	Com TCA
16	+1	+1	-1	+1	A ₂ /B ₂	Com diluição	1:1	Com TCA

Fonte: Dados da Pesquisa, 2014.

Nota: A₁: clorofórmio-isopropanol (95:5 v/v). A₂: hexano. B₁: éter-clorofórmio (1:2 v/v). B₂: diclorometano. F (Fator experimental). TCA (ácido tricloroacético).

3.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

3.5.1 Efeito Matriz

Para avaliar esse parâmetro foi comparada a resposta obtida para as amostras adicionadas do fármaco durante a extração com aquela das amostras preparadas na fase móvel, sob as mesmas condições e concentração do analito de interesse (Equação 1).

$$\text{Efeito matriz (EF)} = \frac{\text{resposta do analito na presença da matriz}}{\text{resposta do analito na ausência da matriz}} \quad (1)$$

3.5.2 Seletividade

Esse parâmetro foi avaliado conforme o preconizado pela legislação vigente, ou seja, mediante a análise de seis amostras de urina provenientes de fontes distintas (BRASIL, 2003). As amostras utilizadas foram provenientes de indivíduos não usuários de medicamentos ou suplementação nutricional (amostras branco). As mesmas foram submetidas ao processo de extração e posteriormente sendo realizada a comparação dos picos cromatográficos obtidos com aqueles da solução do padrão de clonazepam (BRASIL, 2012).

3.5.3 Linearidade

Para a determinação da linearidade foram fortificadas amostras de urina em triplicata nas concentrações de 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 400 $\mu\text{g/mL}$ do padrão clonazepam com adição do diazepam na concentração fixa de 100 $\mu\text{g/ml}$ em todas as amostras. As análises foram realizadas para cada fármaco separadamente. Também foi incluída uma amostra branco (não fortificada) e uma amostra zero (fortificada com o padrão interno).

Os resultados foram tratados estatisticamente através de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e analisados por meio da planilha de validação oriunda do trabalho de Ribeiro (2008). Para tanto, foram considerados os seguintes critérios de aceitação da curva de calibração (BRASIL, 2003, 2012):

➤ Desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para o Limite Inferior de Quantificação (LIQ);

- Desvio menor ou igual a 15 % (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
- No mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;
- O coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,98.

3.5.4 Limites de quantificação e detecção

Os Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram estabelecidos por meio da análise de amostras extraídas de urina de concentrações conhecidas e decrescentes do CLZ. A avaliação foi realizada com base nos parâmetros fornecidos pela curva analítica.

3.5.5 Precisão e exatidão

Durante os ensaios foram determinadas as precisões intra-corrída e inter-corrídas. Durante cada análise ocorreu a preparação das amostras da matriz em estudo que contemplou o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa (25 µg/mL), média (50 µg/mL) e alta (100 µg/mL), com 5 (cinco) réplicas cada. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o Desvio Padrão Relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). Considerando aceitável um coeficiente de variação inferior a 15%, exceto para o Limite Inferior de Quantificação, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2003). O cálculo do coeficiente de variação (CV) se deu da seguinte forma (Equação 2):

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (2)$$

A exatidão foi avaliada em paralelo com a precisão. Desta forma, foram preparadas amostras do fármaco diluído na solução de Acetonitrila-água (40:60 v/v), com concentrações finais iguais às replicatas das amostras da precisão. A partir daí foi calculado a relação entre as áreas obtidas nas amostras fortificadas e as oriundas do fármaco preparado na fase móvel. Para tanto, se utilizou o Erro padrão relativo- EPR (Equação 3):

$$EPR = \frac{(\text{Valor experimental} - \text{valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad (3)$$

Foi considerado o valor experimental como sendo a área do pico do padrão encontrado nas amostras fortificadas e o valor nominal a área do pico correspondente ao padrão diluído na fase móvel. E os critérios de aceitação para a exatidão foram um coeficiente de variação de $\pm 15\%$ para todas as amostras, exceto para o Limite Inferior de Quantificação, para o qual se admite $\pm 20\%$ e um EPR inferior a $\pm 15\%$.

3.5.6 Robustez

A robustez do método proposto foi avaliada mediante a variação em $\pm 10\%$ em relação ao valor otimizado da fase móvel, da temperatura e do comprimento de onda. Para tanto, foi avaliada a influência dessas modificações nos parâmetros de precisão, exatidão e seletividade, utilizando as medidas de coeficiente de variação entre as áreas obtidas dos cromatogramas e dos tempos de retenção em todas as amostras.

4 DADOS E ANÁLISE DA PESQUISA

Segundo Magalhães (2012), os aspectos mais relevantes no desenvolvimento de um método cromatográfico são a separação, a obtenção de resolução satisfatória e um tempo de análise razoável para o analito de interesse. Sendo assim, na fase de desenvolvimento do método o primeiro passo foi a otimização das condições de análise do fármaco e seu padrão interno.

A fase móvel composta por uma mistura de Acetonitrila-água (40:60 v/v) se mostrou a mais eficaz, apresentando o fármaco com pico com boa resolução e tempo de retenção de 3,45 min. Os demais fatores otimizados, tendo em vista a obtenção de tempo de retenção e simetria dos picos satisfatórios são os apresentados na Tabela 02.

Tabela 02. Otimização das condições testadas para a análise do padrão do fármaco clonazepam na concentração de 100 µg/mL.

Condições	Resultados
Comprimento de onda	228 nm
Composição da fase móvel	Acetonitrila-água (40:60 v/v)
Fluxo da fase móvel	0,2 mL/ min
Volume de injeção da amostra	20 µL
Temperatura do forno	40 ° C

Fonte: Dados da pesquisa, 2014.

Nota: v/v se refere à relação volume/volume.

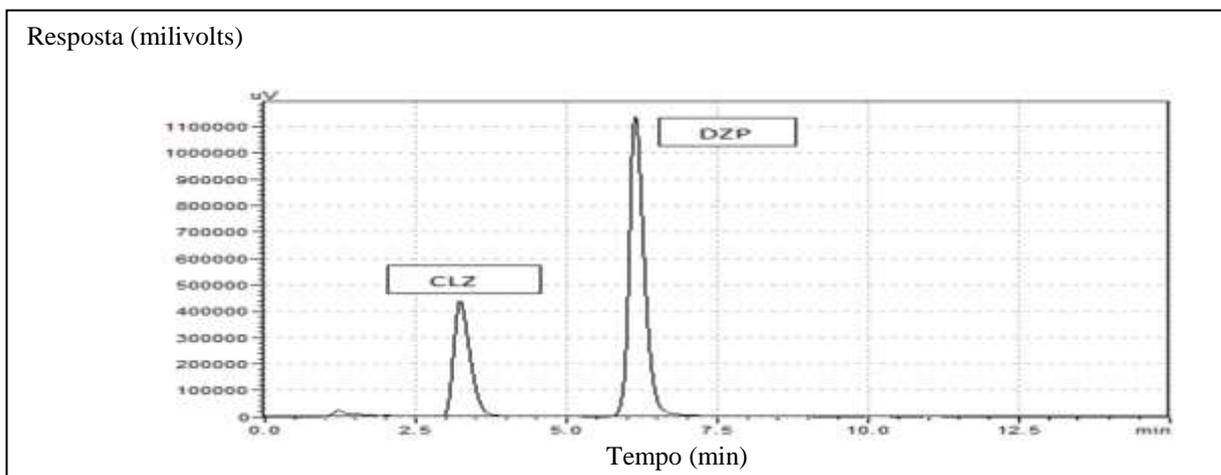
Os dados obtidos corroboraram com o método cromatográfico preconizado pela Farmacopeia Brasileira para determinação do clonazepam por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, sendo o mesmo comprimento de onda empregado e diferindo na composição relativa da fase móvel (BRASIL, 2010). Outros autores utilizaram outras composições de fases móveis igualmente eficazes na separação do analito em estudo, tais como acetonitrila, tampão formiato de amônio e metanol (35:60:5 v/v) e metanol e acetato de amônio em gradiente (CHEZÉ; VILLAIN; PEPÍN, 2004; MAGALHÃES, 2012).

As condições supracitadas forneceram uma corrida analítica capaz de separar de forma eficaz os picos cromatográficos do CLZ e DZP, diferenciando seus tempos de retenção (3,4 e 6,1 min, respectivamente) e fornecendo picos cromatográficos bem distintos (Figura 04).

O método validado é vantajoso em relação a outros semelhantes disponíveis na literatura. A exemplo do proposto por Lima (2009), que utilizando condições relativamente

semelhantes também conseguiu uma separação eficiente de alguns Benzodiazepínicos, entre eles o clonazepam; entretanto com tempo de retenção bem maior, de 10 min.

Figura 04. Cromatogramas da solução com os padrões clonazepam e diazepam na concentração de 100 µg/mL, dissolvidos na fase móvel acetonitrila-água (40: 60 v/v), fluxo 0,1 mL/min



Fonte: dados da pesquisa, 2014.

Nota: CLZ (clonazepam). DZP (diazepam).

A detecção de fármacos da classe dos BZDs na urina é uma análise importante para a identificação de casos de abuso de medicamentos ou superdosagem (MARIN et al., 2008). Todavia, essa matriz biológica apresenta alguns inconvenientes metodológicos, tais como a alta quantidade de sais, proteínas e outros interferentes. Desta forma, uma etapa subsequente ao desenvolvimento do método foram os testes visando à obtenção das condições de extração que garantissem a eliminação da maior parte dos interferentes da matriz urina e paralelamente pequenas perdas do CLZ durante o processo (Tabela 03).

Tabela 03. Condições de extração resultantes do planejamento fatorial e outros procedimentos testados com eficiência para o clonazepam.

Condições	Resultados
Solventes	Éter-clorofórmio (1:2v/v)
pH	Alcalino (pH=9,0)
Proporção solvente-amostra	2:1
Outros procedimentos	Diluição prévia, agitação manual das amostras e uso do Sulfato de sódio anidro como agente redutor de umidade.

Fonte: dados da pesquisa, 2014.

Nota: v/v se refere à relação volume/volume.

O resultado satisfatório em relação à alcalinização do meio se justifica através da equação de Henderson– Hasselbalch. De acordo com ela se pode inferir que pelo fato do CLZ possuir caráter básico o mesmo possui uma baixa ionização em pH igual a 9 e, assim, consegue ser extraído eficientemente pelo éter-clorofórmio (mistura de solventes apolares).

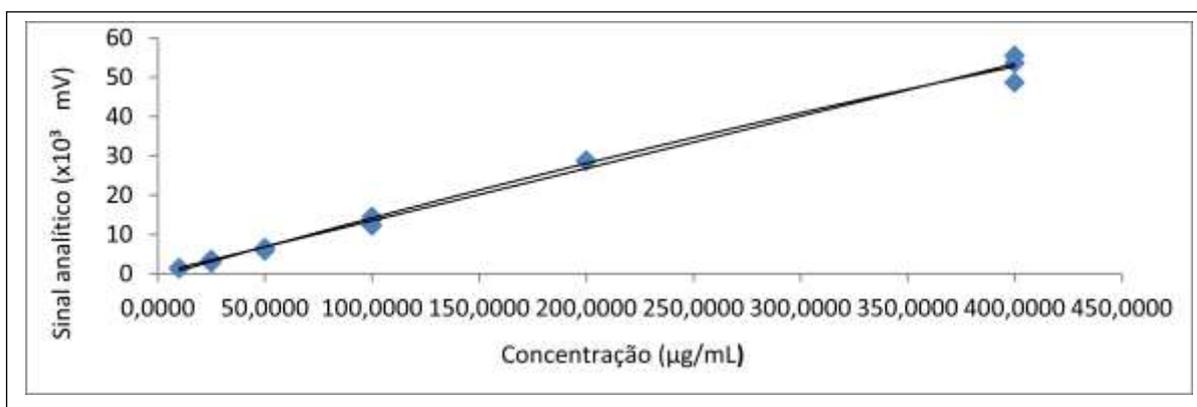
Numa extração de fármacos também classificados como básicos, como o CLZ e DZP, Nascimento (2011), efetuaram a alcalinização da matriz biológica e também conseguiram resultados satisfatórios. Apesar disso, Magalhães (2012), conseguiu uma extração eficiente utilizando como solvente extrator a acetonitrila, a qual possui polaridade superior, entretanto seu processo extrativo possuía maior complexidade metodológica.

Na análise do parâmetro seletividade o método se mostrou adequado, pois as amostras de urina desprovidas do fármaco e submetidas ao processo de extração não apresentaram picos de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito ou próximos dele. Tal constatação está de acordo com o preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

Os dados obtidos evidenciaram um efeito matriz de 0,68; sendo observado que as amostras utilizadas neste ensaio apresentaram um coeficiente de variação de 2,4% nas suas respostas analíticas. Segundo Cassiano et al. (2009), efeito matriz inferior a 1 sugere que ocorreu supressão da ionização do analito pela matriz e os mesmos consideraram aceitável uma variabilidade durante o teste menor que 15%.

Na Figura 04 é apresentada a curva de liberação para o clonazepam. A metodologia desenvolvida se apresentou linear, com coeficiente de correlação (r) de 0,9927 e coeficiente de variação inferior a 15% para o intervalo de concentração de 10,0 a 400,0 µg/mL (Tabela 04). A equação da reta é dada por $y = 133103x + 198817$.

Figura 04. Curva de calibração do clonazepam



Fonte: Dados da pesquisa, 2014.

Os resultados obtidos para a curva de calibração estão de acordo com o preconizado pela legislação vigente, a qual recomenda um valor de $r \geq 0,98$ (BRASIL, 2003). Desta forma, esse valor atesta a correlação entre os resultados e a concentração do analito (tabela 4).

Tabela 04. Valores das áreas dos picos e do coeficiente de variação (CV%) para o clonazepam na curva analítica, 2014.

Concentração	Áreas	Média das áreas ±desvio padrão	CV (%)
10 µg/mL	1362468 1293166 1459818	1371817,3 ± 68713,3	6,1
25 µg/mL	3169922 2769525 3583384	3174277,0 ± 406947	12,4
50 µg/mL	6557287 5906819 6521697	6328601 ± 365707,1	5,8
100 µg/mL	14482786 12205261 13756528	13481525,0 ± 116343	8,6
200 µg/mL	28796352 28608294 28840330	28748325,3 ± 123248,1	0,4
400 µg/mL	55442393 53644248 48634863	52573834,7 ± 3527740,7	6,7

Fonte: Dados da pesquisa, 2014.

Nota: Coeficiente de Variação (CV).

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) possuíram os valores de 37,4 µg/mL e 11,2 µg/mL, respectivamente. Entretanto, a concentração de 200 ng/mL do clonazepam na urina é verificada como a porção eliminada da droga a partir de uma administração de 2-20 mg/dia, dose de tratamento (WEST et al, 2010). Assim, os limites de detecção e quantificação do método proposto são pouco eficazes para detectar dosagens terapêuticas do CLZ.

Todavia, outros trabalhos descritos na literatura obtiveram limites de quantificação e detecção relativamente menores, mas com a utilização de técnicas mais sensíveis, como é o caso das cromatografias com detector acoplado a espectrometro de Massa (LC-MS/MS) ou de arranjo de diodos- DAD (MARIN et al., 2008; WEST et al., 2010).

Contudo, a técnica proposta se propõe a detectar níveis de CLZ na urina provenientes de pacientes intoxicados, os quais geralmente fazem uso de altas dosagens do medicamento alvo. Assim, esses valores foram considerados satisfatórios e são um indicativo de sensibilidade adequada.

Para uma análise confiável do fármaco o método deve ser preciso, ou seja, demonstrar pequena dispersão entre resultados da leitura de uma mesma concentração e exato, representado pelo grau de concordância entre resultados individuais em um mesmo ensaio, ou ensaios independentes, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005).

Nessa perspectiva, os resultados apresentados na Tabela 5 evidenciam que o método é preciso, em termos de Repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia), apresentando valores de CV inferiores a 15%, apresentando uma variação média de 8,9%, indicando que o método desenvolvido apresentou precisão satisfatória.

Tabela 05. Resultados obtidos para os estudos da precisão e exatidão intra-dia e inter-dia, em três ensaios, realizados em quintuplicata para o clonazepam em urina.

Concentração (µg/mL)	Precisão-CV- (%)			Exatidão-EPR- (%)				Recuperação (%)				
	ITD		ITED	ITD		ITED	ITD		ITED			
	I	II		I	II		I	II				
	dia	dia	dia	dia	dia	dia	dia	dia	dia	dia	dia	
25	9	13	10	2	-29	-26	-22	-26	70	73	77	74
50	12	7	5	11	-28	-14	-30	-24	71	85	69	75
100	7	9	4	12	-35	-21	-34	-30	64	78	65	69

Fonte: Dados da pesquisa, 2014.

Nota: Coeficiente de Variação (CV); Erro Padrão Relativo (EPR); ITD (Precisão intra-dia); ITED (Precisão inter-dia).

A exatidão apresentou um valor médio de Erro Padrão Relativo (EPR) de -27% e a taxa média de recuperação se situou em torno de 73% (Tabela 5). Tais valores se encontram fora dos limites preconizados, os quais recomendam medidas de recuperação próximas a 100% e valores de EPR inferiores a 15% (BRASIL, 2003, 2012).

Uma alternativa para contornar esse problema seria a busca de técnicas de extração mais eficientes como a extração em fase sólida ou outros processos, de modo a diminuir a perda do fármaco no processo e evitar resultados falsos negativos durante a aplicação nas amostras de pacientes.

A inexatidão do método prejudica a sua confiabilidade, entretanto é aceitável uma taxa de recuperação inferior a 100%, desde que a extensão da recuperação do analito e do seu padrão interno seja reprodutível (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004). Desta forma, o método em questão atende a esse pressuposto, na medida em que obteve precisão satisfatória e uma recuperação reprodutível durante os ensaios.

Na avaliação da robustez os resultados mostram que o método se revelou robusto frente às alterações na composição da fase móvel e na temperatura, já que para essas condições avaliadas o método manteve-se preciso e com exatidão semelhante às condições otimizadas inicialmente. Quanto à alteração no comprimento de onda, foi verificado que nessa condição o ensaio apresentou precisão e exatidão inferiores ao recomendado, demonstrando essa ser uma condição crítica da análise (Tabela 06).

Tabela 06. Avaliação da robustez quanto aos critérios de precisão e exatidão, os parâmetros modificados e avaliados foram: temperatura, fase móvel e comprimento de onda.

	T (40, 36 e 44 °C)	FM (40:60; 36:54 e 44:56 v/v)	λ (228; 215 e 235nm)
CV% (Precisão)	2,0	1,6	23,8
EPR% (Exatidão)	-27, 5	-27, 6	-32,7

Fonte: Dados da pesquisa, 2014.

Nota: Coeficiente de Variação (CV). Erro Padrão Relativo (EPR). T (temperatura). FM (Fase móvel). λ (comprimento de onda).

Desta forma, os resultados obtidos encontram-se em conformidade com o estabelecido pelos institutos que regulamentam os processos de validação (BRASIL 2003; ICH, 2005). Entretanto, para o fator comprimento de onda (reprovado no referido ensaio) há a necessidade de ser ter controle e precaução com o mesmo durante o método a ser aplicado (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

4 CONCLUSÕES

Nas análises toxicológicas desenvolvidas na atualidade vem sendo preconizada a determinação precisa do agente causador, uma vez que essa conduta facilita o direcionamento para o tratamento adequado e melhora o prognóstico do paciente. Nesse intuito foi desenvolvido e validado um método utilizando Cromatografia Líquida Ultrarrápida (UFLC) para determinar o clonazepam em amostras de urina.

Os resultados dos parâmetros de validação avaliados foram correspondentes com os critérios de aceitação utilizados, atestando que o método é linear no intervalo de trabalho sugerido, apresenta boa precisão, além de possuir limites de detecção e quantificação adequados para a análise a que se destina. Além disso, o método demonstrou robustez quando exposto a variações deliberadas nas condições experimentais estabelecidas.

Entretanto, se faz necessário análises posteriores visando melhorar alguns aspectos da validação como a recuperação e a exatidão. Nesse sentido, se propõe a busca de técnicas de extração mais eficientes, de modo a diminuir a perda do fármaco no processo e evitar resultados falsos negativos durante a aplicação nas amostras de pacientes. Além disso, o acréscimo de outras figuras de mérito como os estudos de estabilidade aumentaria a confiabilidade das análises.

Dessa maneira, se conclui que a metodologia desenvolvida e validada poderá ter seu uso efetivado no diagnóstico laboratorial e prognóstico das intoxicações por clonazepam, com a vantagem de possuir menor custo e tempo de realização se comparada a outros métodos. Além disso, poderá ser utilizado na triagem em serviços de emergência e, conseqüentemente, nas condutas clínicas adotadas, facilitando o tratamento e o prognóstico dos pacientes atendidos nos serviços de atendimento toxicológico na Rede do SUS.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN BIOANALYTICAL METHOD FOR ULTRA FAST LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF CLONAZEPAM IN URINE

PEREIRA, Helimarcos Nunes¹; FOOK, Sayonara Maria Lia²

ABSTRACT

The recognition of a condition of intoxication by drugs is done by clinical and laboratory diagnosis. For laboratory diagnosis, the toxicological analyzes assist when the history is unclear and the symptoms are moderate to severe. There are several methods for identification of toxic agents in biological samples. The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) have been used, since the validation parameters of the methodology are followed. In view of this problem the present work aimed to develop an analytical methodology for identification and quantification of clonazepam in urine. The chromatographic tests were realized and adapted according to the requirements established by Resolutions –RE n°.27, May 17, 2012 and n°. 899, May 29, 2003 for the National Agency for Sanitary Vigilance. During the validation process were optimized the extraction process Clonazepam in urine and chromatographic analysis, being obtained appropriate conditions. And were also evaluated with satisfactory results the parameters selectivity, matrix effect, linearity, accuracy, precision, recovery and robustness, proving the efficiency and reliability of the method. In the occurrence of toxic events the utilization of validated analytical methodologies is a useful tool to secure efficient methods to detect toxic agents and help in the diagnosis and prognosis of intoxications. Thus, the methodology analysis of clonazepam for ultra-fast liquid chromatography can be a useful tool in the clinical management of the patient intoxicated by this drug.

Keywords: Chromatography. Toxicology. Methodology.

¹Academic in Pharmacy from the State University of Paraíba.
nunesp1@live.com.

²Teacher (a) doctor (a) of the Pharmacy department of the State University of Paraíba.
sayonarafook@yahoo.com.br.

REFERÊNCIAS

- ADAMOWICZ, P; KAŁA, M. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography–electron ionization-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 198, n. 1, p. 39-45, 2010.
- AMARAL, R. A.; MALBERGIER, A.; DE ANDRADE, A. G. Manejo do paciente com transtornos relacionados ao uso de substância psicoativa na emergência psiquiátrica. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. Supl II, 2010.
- AMÉRICO, M. A.; MOSSIN, S. A. G.; NISHIYAMA, P. Perfil de fármacos por espectrofotometria no ultravioleta. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Paraná, v. 40, n. 4, p. 257-259, 2008.
- AUCHEWSKI, L. et al. Avaliação da orientação médica sobre os efeitos colaterais de benzodiazepínicos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 1, p. 24-31, 2004.
- BARES, I. F.; PEHOURCQ, F.; JARRY, C. Development of a rapid RP–HPLC method for the determination of clonazepam in human plasma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 4, p. 865-869, 2004.
- BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**. São Paulo, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.
- BATISSE, A. et al. EPA-0437–Impact of legislation change on clonazepam abuse. **European Psychiatry**, v. 29, p. 1, 2014.
- BETTIOL, R. S. **Análise da prevalência da utilização de benzodiazepínicos em uma farmácia de um município do sul de Santa Catarina**. 2012. 55f. Monografia (Graduação em Farmácia). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade do Extremo Sul Catarinense. - UNESC. Criciúma, 2012.
- BORGES, K. B. et al. Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid–liquid and solid-phase extractions in human plasma. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 233-241, 2009.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 27, de 17/05/2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, 22 Mai. 2012.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Relação nacional de medicamentos essenciais. 7. ed. Brasília (DF); 2007.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 2 Jun. 2003.

BULCÃO, R. P. et al. Intoxicação em cães e gatos: diagnóstico toxicológico empregando cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta pressão com detecção ultravioleta em amostras estomacais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1109-1113, 2010.

CAMILLO, E. **Desenvolvimento de método para a determinação de nicotina e clozapina em plasma humano utilizando CLAE-UV**. 2014. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CASTRO, G. L. G. et al. Uso de Benzodiazepínicos como automedicação: consequências do uso abusivo, dependência, farmacovigilância e farmacoepidemiologia. **Revista Interdisciplinar**, v. 6, n. 1, p. 112-123, 2013.

CHARNEY, D.S; MIHIC, S. J; HARRIS, R.A. Hipnoticos e sedativos. In GOODMAN, L. S; GILMAN, A; BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro, 2006, 11. ed. p. 359-381.

CHÈZE, M.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes. **Forensic science international**, v. 145, n. 2, p. 123-130, 2004.

COELHO, A. S. C. **Avaliação enzimática e histológica dos efeitos decorrentes da exposição aguda ao diazepam em *Gambusia Holbrook***. 2011. 52f. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2011.

COELHO, F. M. S. et al. Benzodiazepínicos: uso clínico e perspectivas. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 63, n. 5, p. 196-200, 2006.

COUTINHO, F. M. F. **Uso do método LC-DAD-MS na análise de benzodiazepinas em amostras post-mortem**. 2007. 158f. Dissertação (Mestrado em Química analítica e controle de qualidade). Departamento de Química. Universidade de Aveiro. Aveiro, 2007.

CRUZ, A. V. et al. Uso crônico de diazepam em idosos atendidos na rede pública em Tatuí-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 3, p. 259-267, 2009.

DRUGBANK 3.0. 2005. Clonazepam. Disponível em: <
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01068> >. Acesso em: 18 Mar 2014.

FELLI, M.; MARTELLO, S.; CHIAROTTI, M. LC-MS-MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests. **Forensic Science International** v. 204, n.1-3: p. 67-73, 2011.

FERNER, R. E. Post-mortem clinical pharmacology. **British journal of clinical pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 430-443, 2008.

FERRAZ, J. A. M. B. **Efeito do substituinte “F” nas interações “fármaco- receptor” em benzodiazepinas**. 2010. 99f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2010.

FORSAN, M. A. **O uso indiscriminado de benzodiazepínicos: uma análise crítica das práticas de prescrição, dispensação e uso prolongado**. 2010. 26f. Monografia (Especialização em Atenção básica em saúde da família). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FRANÇA, G. V. de. **Fundamentos da medicina legal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. In: **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Informação Científica e Tecnológica/Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento. Brasil, 2011.

GANANÇA, M. M. et al. Clonazepam in the pharmacological treatment of vertigo and tinnitus. **International Tinnitus Journal**, v. 8, n. 1, p. 50-53, 2002.

GANNU, R. et al. Development of ultra fast liquid chromatographic method for simultaneous determination of nitrendipine and carvone in skin diffusate samples. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 50, n. 5, p. 1080-1084, 2009.

GOLAN, D. E. **Princípios da Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOODMAN, L. S; GILMAN, A; BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

HOLLER et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

JOYA et al. Gas chromatography–mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. **Forensic Science International**. v. 196, n.1-3, p. 38-42, 2010.

KIM et al. Rapid and simple determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in human hair by gas chromatography–mass spectrometry using micro-pulverized extraction. **Forensic Science International**. v. 196, n. 1-3, p.43-50, 2010.

LIMA, A. P. S de. **Desenvolvimento de métodos eletroforéticos e cromatográficos para a determinação de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas**

para emagrecimento. 2009. 121f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2009.

MAGALHÃES, E.J. **Desenvolvimento de métodos para quantificação de drogas em matrizes de interesse forense.** 2012. 152p. Tese (Doutorado em Ciências – Química). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANGINI JUNIOR, Z.A. **Condicionantes relacionados ao uso crônico de Clonazepam no Brasil: uma história de vida.** 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em saúde coletiva), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2013.

MARIN, S. J. et al. Quantitation of benzodiazepines in urine, serum, plasma, and meconium by LC-MS-MS. **Journal of analytical toxicology**, v. 32, n. 7, p. 491-498, 2008.

NASCIMENTO, F. E. do. **Determinação da Amitriptilina e do seu metabolito Nortriptilina em sangue por GC/MS.** 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de Coimbra. Coimbra, 2011.

NEGRUSZ, A. et al. Elimination of 7-aminoclonazepam in urine after a single dose of clonazepam. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 376, n. 8, p. 1198-1204, 2003.

OGA, S., CAMARGO, M.M. de A., BATISTUZZO, J. A.O. **Fundamentos da Toxicologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu editora, 2014.

PANDA, S. S. et al. New Stability-Indicating RP-UFLC Method for Determination of Trosipium Chloride in Tablet Dosage Form. **Scientia pharmaceutica**, v. 80, n. 4, p. 955, 2012.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. Palestra. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.227-229, 2002.

RANG, H. P; DALE, M. M. **Rang & Dale farmacologia.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RIBANI, M. et. al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, V.27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

ROSA, P. C. P. **Preparação, caracterização da fase estacionária C8, com grupo polar uréia embutido e aplicações na análise e no desenvolvimento e validação de métodos**

para determinação de fármacos. 2010. 221f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

SALOMONE, A.; et al. A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 56(3): 582-59, 2011.

SEBBEN, V. C. et al. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. **Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial,** v. 46, n. 2, p. 143-48, 2010.

SMINK, B. E. et al. The relation between the blood benzodiazepine concentration and performance in suspected impaired drivers. **Journal of forensic and legal medicine,** v. 15, n. 8, p. 483-488, 2008.

SUN, N. et al. An ultra-fast LC method for the determination of iodiconazole in microdialysis samples and its application in the calibration of laboratory-made linear probes. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis,** v. 51, n. 1, p. 248-251, 2010.

TELLES FILHO, P. C. P. et al. Utilização de benzodiazepínicos por idosos de uma estratégia de saúde da família: implicações para enfermagem. **Escola Anna Nery.** Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 581-586, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). 28. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2009.

VALENTINI, S.; SOMMER, WILLY A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar,** v. 11, n. 2, p. 26-31, 2013.

VIETTE, V. et al. A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography–hybrid tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry.* v. 44, n.1, p. 32-44, 2011.

VOLONTÉ, M. G. et al. Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de carbamacepina en plasma humano. **Latin American Journal Pharmacy,** v. 28, p. 80-5, 2009.

WEST, R. et al. Comparison of clonazepam compliance by measurement of urinary concentration by immunoassay and LC-MS/MS in pain management population. **Pain physician,** v. 13, n. 1, p. 71-78, 2010.